

スペクトル型セルアナライザーSA3800を用いた皮膚アレルギー反応評価試験「h-CLAT」

背景

化学物質による皮膚アレルギー反応の評価は、化粧品や医薬部外品の安全性評価において重要な評価項目であるが、従来はモルモットやマウス、ブタなどの実験動物の皮膚に過剰量の化学物質を塗布するなどして反応を観察する方法が実施されてきた。しかし近年、動物実験に対する問題意識が高まり、2013年には動物実験による安全性評価が行われた成分を含む化粧品の販売禁止が法制化された。そこで、実験動物を用いない *in vitro* の代替評価法の開発が進められた結果、皮膚感作反応で重要な役割を担う樹状細胞のモデルであるヒト単球由来の培養細胞であるTHP-1細胞を用いて、T細胞への抗原提示に際に機能するCD86と、同じくT細胞との相互作用分子として機能するCD54を活性化の指標とし、化学物質への暴露によるこれら表面マーカーの発現量の変化をフローサイトメーターにて評価するhuman Cell Line Activation Test (h-CLAT) と呼ばれる手法が提案され (文献1)、2016年にはOECDのガイドライン (文献2) に記載された。本アプリケーションノートでは、スペクトル型セルアナライザーSA3800にてh-CLATによる化学物質の皮膚アレルギー試験を模した実験を実施し、その適用性やユーザビリティを確認した結果を紹介する。

サンプル・装置

- ・ 4-hydroxy benzoic acid (陰性物質モデル)
- ・ 2-Bromo-2- (bromomethyl) -pentanedinitrile (MDBGN) (陽性物質モデル)
- ・ スペクトル型セルアナライザーSA3800

方法

各種試薬やプロトコールはOECDガイドラインを踏襲した。試験する2種の化学物質の濃度に関しては既報論文 (文献3) と同濃度を採用した。得られたh-CLATの評価結果を文献3の試験結果と比較した。

また、今回の検討では、未染色コントロールも加えた総計48サンプルを4サンプル測定毎にagitation機能を利用しながら、1回のスタートで全ての測定を終えた。

尚、RFIを算出するために使用するgeometric mean値はFlowJo (FlowJo, LLC) を使用して算出した。

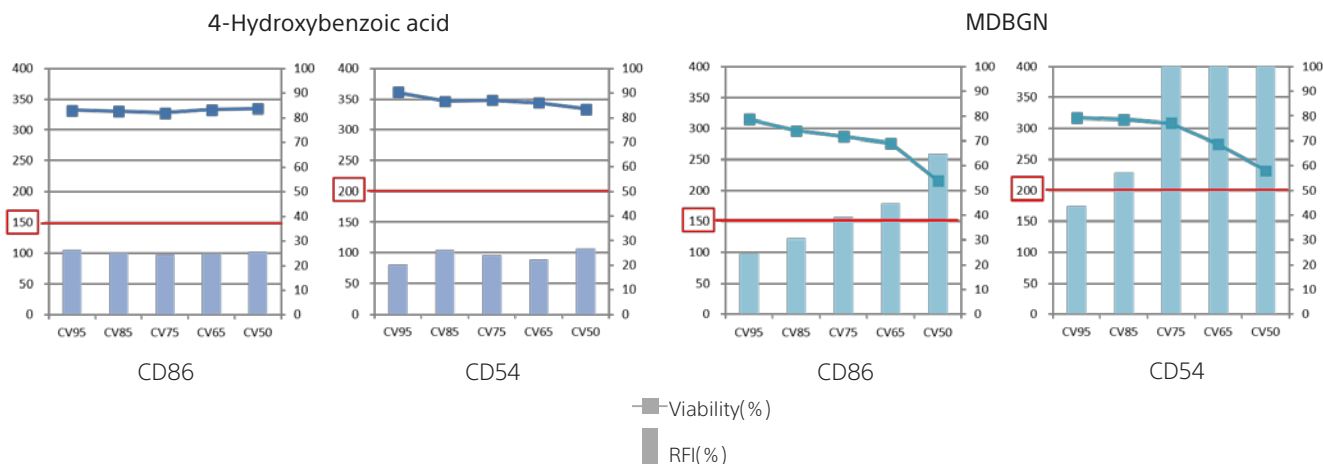


図1. h-CLATの結果

棒グラフ (左側軸) はコントロールとの蛍光量の比を表すRFI (%) *を、折れ線グラフ (右側軸) は化学物質の各濃度での細胞の生存率 (%) を示している。

CD86におけるRFI 150%、CD54におけるRFI 200%を超える値が得られた場合、その化学物質はh-CLAT陽性と判定される。

$$*RFI = \frac{\text{MFI of chemical-treated cells} - \text{MFI of chemical-treated isotype control cells}}{\text{MFI of vehicle-treated cells} - \text{MFI of vehicle-treated isotype control cells}} \times 100$$

結果

h-CLATでの評価結果について、既に報告のある2種の化学物質について実験を実施したところ、4-hydroxy benzoic acidではCD86とCD54のいずれにおいても発現量の変化は基準値 (RFI150%, RFI200%) を超えなかった。

一方、MDBGNではいずれにおいても基準値を超える発現量の変化が観察され、既報と同様の判定結果となった (図1)。

考察

h-CLATはOECDのガイドラインによって実験手法が詳細に指定されている。そのプロトコールは化学物質の試験濃度を決定する実験とCD86、CD54の発現量の相対変化を定量する実験から構成されている。いずれの実験も必然的にサンプル数が多くなり実験者の労力は決して軽いものとは言えない。

スペクトル型セルアナライザーSA3800は、高速・低キャリアオーバー・空吸い検出機能を備えた3D AutoSamplerを搭載しており、5mL tube、96 wells plate、384 wells plateにも対応している。また、一定の間隔で細胞を攪拌するための agitationを加えることも可能であり、今回の実験でも細胞の沈澱を抑制しながら、短時間で最後の検体まで自動で測定を終えることができた。スペクトル型セルアナライザーSA3800のこの特徴はh-CLATに限らず、多数の検体を対象とした試験での実験者の労力を大幅に軽減するであろう。

h-CLATは実験動物を使用しない毒性試験を可能にし、コスト削減にも寄与することから多くの研究施設で採用されている一方で、施設間での再現性に問題があるとの指摘もある (文献4)。

スペクトル型セルアナライザーSA3800

多数の検体を高速・簡便に解析できる全自動スペクトル型セルアナライザー

・ Spectral Technology

ソニー独自の「スペクトル解析」を採用。細胞一つ一つから得られる蛍光スペクトルを検出し、アンミキシング計算により客観性の高い解析を実現。細胞由来の自家蛍光も測定・分離ができ、高精度解析が可能

・ Smooth workflow

機器管理から解析までの快適なワークフローを実現。シングルステイン・フリーと長時間自動測定機能の充実により大幅に作業効率を改善

・ Easy to use integration

直感的かつ効率的に作業が行える、分かりやすいユーザーインターフェース

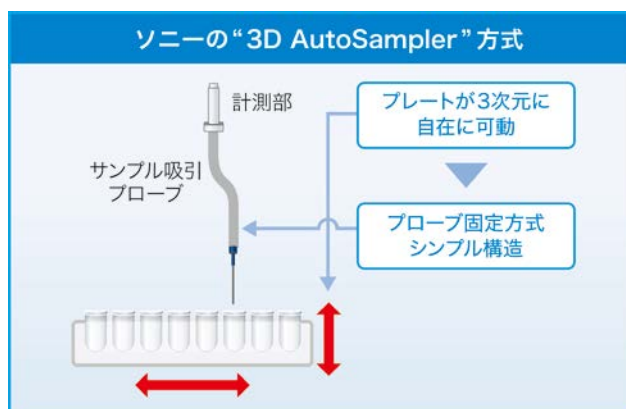


このことは実験に用いる培養細胞の品質や状態、各施設での実験者の熟練度の差異に主な原因があると考えられているが、測定する装置間の感度やスループットの差異を最小限にすることで、より改善する可能性もある。

スペクトル型セルアナライザーSA3800は、蛍光検出に用いる32チャンネルのPMT (Photomultiplier Tube) の感度を自動で調節することで出力されるデータを標準化し、各装置間での結果を比較することを可能にするStandardization機能を有している。

上記の3D AutoSampler と、このStandardization機能を合わせることで、共同研究施設間での再現性が向上する可能性がある。

更にソニー独自のスペクトル解析により、多色化への対応や自家蛍光の分離といった、より高度な解析にも対応可能であり、幅広い研究への応用も期待できる。



96ウェルや384ウェルプレートを始め、実験現場で頻りに利用される様々な容器へ幅広く対応します。

参考文献

1. Ashikaga T, *et al.* Toxicol In Vitro. 2006 Aug;20(5):767-73.
2. http://www.oecd-ilibrary.org/environment/test-no-442e-in-vitro-skin-sensitisation_9789264264359-en
3. Sakaguchi H, *et al.* Arch Dermatol Res. 2007 Feb;298(9):427-37.
4. http://www.jacvam.jp/files/news/20170113_1.pdf

発行元

ソニーイメージングプロダクツ&ソリューションズ(株)
ライフサイエンス営業部
〒243-0014 神奈川県厚木市旭町 4-14-1
Tel: 0120-667-010
Fax: 0120-388-060
E-mail: cytometry@sony.com
URL: <http://www.sony.co.jp/LS>

